

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 32 930.3

**Anmeldetag:** 19. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** Consortium für elektrochemische  
Industrie GmbH, München/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur fermentativen Herstellung  
von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten  
der Phosphoglycerat-Familie

**IPC:** C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. Mai 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Dzierzon**

## **Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie wie beispielsweise O-Acetyl-L-Serin, N-Acetyl-L-Serin, L-Cystein, LL-Cystin und L-Cystein-Derivaten mittels Fermentation.

Die Herstellung der zwanzig natürlichen, proteinogenen Aminosäuren wird heutzutage vorwiegend durch Fermentation von Mikroorganismen bewerkstelligt. Dabei wird ausgenutzt, dass Mikroorganismen über entsprechende Biosynthesewege zur Synthese der natürlichen Aminosäuren verfügen.

Solche Biosynthesewege unterliegen jedoch in Wildtyp-Stämmen einer strengen Kontrolle, die gewährleistet, dass die Aminosäuren nur zum Eigenbedarf der Zelle hergestellt werden. Eine wichtige Voraussetzung für effiziente Produktionsprozesse ist es deshalb, dass geeignete Mikroorganismen verfügbar sind, die im Gegensatz zu Wildtyp-Organismen eine drastisch gesteigerte Produktionsleistung für die Herstellung der gewünschten Aminosäure aufweisen.

Solche Aminosäure-überproduzierende Mikroorganismen können durch klassische Mutations-/Selektionsverfahren und/oder durch moderne, gezielte, rekombinante Techniken („metabolic engineering“) erzeugt werden. Bei letzterem werden zunächst Gene oder Allele identifiziert, die durch ihre Veränderung, Aktivierung oder Inaktivierung eine Überproduktion bewirken. Diese Gene/Allele werden dann durch molekularbiologische Techniken in einen Mikroorganismenstamm eingebracht oder inaktiviert, so dass eine optimale Überproduktion erzielt wird. Häufig führt jedoch erst die Kombination mehrerer, verschiedener Maßnahmen zu einer wirklich effizienten Produktion.

Die Phosphoglycerat-Familie von Aminosäuren ist dadurch definiert, dass es sich um Aminosäuren handelt, die in ihrer Bio-

Beglaubigte Kopie  
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DUPLIKAT

INTERNATIONAL FORM

Consortium für elektrochem.  
Industrie GmbH  
Zielstattstr. 20  
81379 München

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen  
und Zellkulturen GmbH  
*V. Weis* 04.08

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Consortium für elektrochem. Industrie GmbH Address: Zielstattstr. 20 81379 München	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 10172  Date of the deposit or the transfer <sup>1</sup> : 1995-08-18
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1995-08-21 <sup>2</sup> . On that date, the said microorganism was  <input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	
<b>IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED<sup>4</sup></b>	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  <i>V. Weis</i>  Date: 1995-08-23

- <sup>1</sup> Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).  
<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.  
<sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.  
<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

synthese von der 3-Phosphoglycerinsäure abgeleitet werden. Der natürliche Pfad des Stoffwechsels führt dabei zunächst über die Zwischenstufen 3-Phosphohydroxypyruvat und 3-Phospho-L-serin zu L-Serin. L-Serin kann weiterhin zu Glycin bzw. über  
5 O-Acetyl-L-Serin zu L-Cystein umgesetzt werden.

Für die fermentative Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie, insbesondere von L-Serin und L-Cystein, sind bereits einige Gene/Allele im Stand der Technik  
10 bekannt, deren Einsatz zu einer Aminosäure-Überproduktion führen:

- serA-Allele wie beschrieben in EP0620853B1 oder EP0931833A2.

15 Diese serA-Allele kodieren für 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die einer verminderten Feedback-Hemmung durch L-Serin unterliegen. Dadurch wird die Bildung von 3-Hydroxypyruvat weitgehend vom Serin-Spiegel der Zelle entkoppelt.

20

- cysE-Allele wie beschrieben in
  - WO 97/15673 (hereby incorporated by reference) oder
  - Nakamori S. et al., 1998, Appl. Env. Microbiol. 64: 1607-1611 (hereby incorporated by reference) oder
  - 35 - Takagi H. et al., 1999, FEBS Lett. 452: 323-327 beschrieben, in einen Mikroorganismenstamm eingebracht werden.Diese cysE-Allele kodieren für Serin-O-Acetyl-Transferasen, die einer verminderten Feedback-Hemmung durch L-Cystein unterliegen. Dadurch wird die Bildung von O-Acetyl-L-Serin  
30 bzw. L-Cystein weitgehend vom Cystein-Spiegel der Zelle entkoppelt.

35

- Efflux-Gene wie beschrieben in EP0885962A1  
Das beschriebene orf-Gen kodiert wahrscheinlich für ein  
Efflux-System, das zur Ausschleusung von Antibiotika und  
anderen toxischen Stoffen geeignet ist und die Überproduktion von L-Cystein, L-Cystin, N-Acetyl-Serin und/oder Thiazolidinderivaten bewirkt.

- cysB-Gen wie beschrieben in DE19949579C1

Das cysB-Gen kodiert für einen zentralen Genregulator des Schwefelstoffwechsel und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Sulfid für die Cystein-Biosynthese.

Aus dem Stand der Technik ist ebenfalls bekannt, dass die angegebenen Verfahren auch zu Cystein-Derivaten führen können.

So kann LL-Cystin als Oxidationsprodukt von L-Cystein oder 2-Methyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure als Kondensationsprodukt von L-Cystein und Pyruvat während der Fermentation entstehen. Da L-Cystein der zentrale Schwefel-Donor der Zelle ist, können die beschriebenen Verfahren auch als Ausgangspunkt zur Herstellung verschiedenster schwefelhaltiger Metaboliten (z.B. L-Methionin, (+)-Biotin, Thiamin etc.) benutzt werden, die im Sinne der vorliegenden Erfindung als L-Cystein-Derivate aufzufassen sind.

Außerdem wurde beschrieben, dass bei geeigneter Vorgehensweise auch die Aminosäuren N-Acetyl-L-Serin (EP-A1-0885962) bzw. O-Acetyl-L-Serin (DE-A-10107002) als Hauptfermentationsprodukte gebildet werden können. L-Serin kann wiederum gemäß DE-A-10219851 relativ einfach aus N-Acetyl-L-Serin-haltigen Fermentationsbrühen gewonnen werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen rekombinanten Mikroorganismenstamm zur Verfügung zu stellen, der eine Überproduktion von Aminosäuren oder Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie ermöglicht. Eine weitere Aufgabe ist es, ein fermentatives Verfahren für die Herstellung von Aminosäuren oder Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie mittels des rekombinanten Mikroorganismenstammes zur Verfügung zu stellen.

Die erstgenannte Aufgabe wird gelöst durch einen Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Derivaten geeignet ist,

herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, daß er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität des yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.

5

Eine Erhöhung der Aktivität des yfiK-Genprodukts ist im Sinne der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn durch eine Erhöhung der Genproduktmenge in der Zelle eine erhöhte Gesamtaktivität in der Zelle erreicht wird und somit die spezifische Aktivität des Genprodukts zwar unverändert bleibt, aber die Aktivität des yfiK-Genprodukts pro Zelle erhöht ist.

10

Das yfiK-Gen von *Escherichia coli* wurde im Rahmen der Genomsequenzierung (Blattner et al. 1997, Science 277:1453-1462) als offener Leserahmen identifiziert und kodiert für ein Protein mit 195 Aminosäuren. Bisher konnte dem yfiK-Gen keine physiologische Funktion zugeordnet werden. Auch eine Datenbankrecherche nach Proteinen mit Sequenzhomologie (FASTA-Algorithmus von GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) liefert wenig Aufschluß, da lediglich Ähnlichkeiten zu Proteinen angezeigt werden, deren Funktion ebenfalls unbekannt ist. Der einzige Anhaltspunkt für eine mögliche Aktivität des yfiK-Genproduktes ist bei Aleshin et al. (Trends in Biol. Sci., 1999, 24: 133-135) zu finden. Darin wird ein Strukturmotiv postuliert, das eine Proteinfamilie von Aminosäure-Efflux-Proteinen charakterisieren soll. Da dieses schwache Consensus-Motiv auch im YfiK-Protein vorkommt, könnte das YfiK-Protein ein Efflux-System für Aminosäuren darstellen. Es ist jedoch für den Fachmann absolut unmöglich, daraus Schlüsse auf konkrete Aminosäuresubstrate des YfiK-Protein zu ziehen. Der Befund, dass das YfiK-Genprodukt bei der Produktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie einen positiven Beitrag leistet, ist insbesondere deshalb überraschend, da mit dem YdeD-Genprodukt bereits ein Efflux-Protein für Aminosäuren der Phosphoglyceratfamilie in *Escherichia coli* charakterisiert wurde (Daßler et al. Mol. Microbiol., 2000, 36: 1101-1112) und die Existenz eines zweiten Systems völlig unerwartet ist. In-

15

20

30

35

teressanterweise bestehen keine Strukturähnlichkeiten zwischen den yfiK- und ydeD-Genprodukten.

Das yfiK-Gen und das YfiK-Genprodukt (YfiK-Protein) sind durch die Sequenzen SEQ ID No. 1 beziehungsweise SEQ ID No. 2 charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als yfiK-Homologe solche Gene aufzufassen, die bei einer Analyse mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) eine Sequenzidentität von größer 30 % aufweisen. Besonders bevorzugt ist eine Sequenzidentität von größer 70 %.

Ebenso sind Proteine mit einer Sequenzidentität von größer 30 % (Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) als YfiK-homologe Proteine aufzufassen. Besonders bevorzugt ist eine Sequenzidentität von größer 70 %.

Somit sind als yfiK-Homologe auch Allelvarianten des yfiK-Gens zu verstehen, insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz ableiten, wobei die enzymatische Aktivität des jeweiligen Genprodukts jedoch erhalten bleibt.

Erfindungsgemäße Mikroorganismen, die eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität des yfiK-Genprodukts aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie erzeugt werden.

Als Ausgangsstämme sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die den Biosyntheseweg für Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie aufweisen, rekombinanten Verfahren zugänglich sind und durch Fermentation kultivierbar sind. Solche Mikroorganismen können Pilze, Hefen oder Bakterien sein. Bevorzugt handelt es sich um Bakterien der phylogenetischen Gruppe der Eubacteria. Besonders bevorzugt um Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae und insbesondere der Art Escherichia coli.

Die Erhöhung der Aktivität des yfiK-Genprodukts im erfindungs-  
gemäßen Mikroorganismus wird beispielsweise durch eine ver-  
stärkte Expression des yfiK-Gens erreicht. Dabei kann die Ko-  
pienzahl des yfiK-Gens in einem Mikroorganismus erhöht sein  
und/oder es kann durch geeignete Promotoren die Expression des  
yfiK-Gens gesteigert sein. Unter verstärkter Expression ist  
dabei vorzugsweise zu verstehen, daß das yfiK-Gen mindestens  
doppelt so stark exprimiert wird, wie im Ausgangsstamm.

Die Erhöhung der Kopienzahl des yfiK-Gens in einem Mikroorga-  
nismus kann mit dem Fachmann bekannten Methoden vorgenommen  
werden. So kann zum Beispiel das yfiK-Gen in Plasmid-Vektoren  
mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pA-  
CYC184 für *Escherichia coli*) kloniert und in den Mikroorganis-  
mus eingebracht werden. Alternativ kann das yfiK-Gen mehrfach  
ins Chromosom eines Mikroorganismus integriert werden. Als In-  
tegrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperen-  
ten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration  
über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et  
al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617-4622).

Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung ei-  
nes yfiK-Gens in Plasmid-Vektoren unter der Kontrolle eines  
Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl  
in *Escherichia coli* durch Klonierung eines yfiK-Gens in einem  
pACYC-Derivat wie z. B. pACYC184-LH (hinterlegt gemäß Budapes-  
ter Vertrag bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und  
Zellkulturen, Braunschweig am 18.8.95 unter der Nummer DSM  
10172).

Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-kodierten  
yfiK-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des  
Gens dienen.

Die verstärkte Expression eines yfiK-Gens kann jedoch insbe-  
sondere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechen-  
de Promotorsysteme wie beispielsweise in *Escherichia coli* der



konstitutive GAPDH-Promotor des gapA-Gens oder die induzierbaren lac-, tac-, trc-, lambda-, ara oder tet-Promotoren sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Solche Konstrukte können in an sich bekannter  
5 Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind oder daß gemäß der „codon usage“ seltene Kodons gegen häufiger vorkommende Kodons ausgetauscht werden.  
10

Mikroorganismenstämme mit den genannten Modifikationen sind  
15 bevorzugte Ausführungen der Erfindung.

Die Klonierung eines yfiK-Gens in Plasmid-Vektoren erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette yfiK-Gen erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.  
20

Als bevorzugte Vektoren für die Klonierung eines yfiK-Gens werden Plasmide verwendet, die bereits Promotoren zur verstärkten Expression enthalten, beispielsweise den konstitutiven GAPDH-Promotor des gapA-Gens von Escherichia coli.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.  
30

Des weiteren sind Vektoren besonders bevorzugt die bereits ein Gen/Allel enthalten, dessen Einsatz zu einer Überproduktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie führt, wie beispielsweise das cysEX-Gen (W097/15673). Solche Vektoren ermöglichen die direkte Herstellung von erfindungsgemäßen Mikroorganismenstämmen mit hoher Aminosäure-Überproduktion aus einem beliebigen Mikroorganismenstamm, da ein solches Plasmid auch  
35

eine Verminderung der Feedback-Hemmung des Cysteinstoffwechsels in einem Mikroorganismus bewirkt.

5 Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein genetisches Element zur Deregulierung des Cysteinstoffwechsels sowie ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.

10 Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die yfiK-haltigen Plasmide in Mikroorganismen eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

15 Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Mikroorganismenstammes, dadurch gekennzeichnet, daß in einen Ausgangsstamm ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.

20 Die Produktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Mikroorganismenstammes erfolgt in einem Fermenter nach an und für sich bekannten Verfahren.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein erfindungsgemäßer Mikroorganismenstamm in einer Fermentation eingesetzt wird und die produzierte Aminosäure aus dem Fermentationsansatz abgetrennt wird.

30 Die Anzucht des Mikroorganismenstammes im Fermenter erfolgt als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder vorzugsweise als fed-batch-Kultur. Besonders bevorzugt wird eine C-Quelle während der Fermentation kontinuierlich zudosiert.

35 Als C-Quelle dienen vorzugsweise Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren. Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren als C-Quellen Glukose, Laktose oder Glycerin eingesetzt.

Bevorzugt ist die Dosierung der C-Quelle in einer Form, die gewährleistet, dass der Gehalt an C-Quelle im Fermenter während der Fermentation in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l gehalten wird. Besonders bevorzugt ist ein Bereich von 0,5 - 10 g/l.

Als N-Quelle werden im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysate verwendet. Bei Verwendung von Ammoniak als Korrekturmittel zur pH-Statistisierung wird während der Fermentation regelmäßig diese N-Quelle nachdosiert.

Als weitere Medienzusätze können Salze der Elemente Phosphor, Chlor, Natrium, Magnesium, Stickstoff, Kalium, Calcium, Eisen und in Spuren (d.h. in  $\mu\text{M}$  Konzentrationen) Salze der Elemente Molybdän, Bor, Kobalt, Mangan, Zink und Nickel zugesetzt werden.

Des weiteren können organische Säuren (z.B. Acetat, Citrat), Aminosäuren (z.B. Isoleucin) und Vitamine (z.B. B1, B6) dem Medium zugesetzt werden.

Als komplexe Nährstoffquellen können z.B. Hefeextrakt, Maisquellwasser, Sojamehl oder Malzextrakt zum Einsatz kommen.

Die Inkubationstemperatur für mesophile Mikroorganismen beträgt vorzugsweise 15 - 45 °C, besonders bevorzugt 30 - 37 °C.

Die Fermentation wird vorzugsweise unter aeroben Wachstumsbedingungen durchgeführt. Der Sauerstoffeintrag in den Fermenter erfolgt mit Pressluft oder mit reinem Sauerstoff.

Der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt während der Fermentation bevorzugt im pH-Bereich von 5,0 bis 8,5, besonders bevorzugt ist ein pH-Wert von 7,0. Ist die erfindungsgemäße Herstellung von O-Acetyl-L-Serin gewünscht, liegt der besonders bevorzugte pH-Bereich zwischen 5,5 und 6,5.

Für die Herstellung von L-Cystein und L-Cystein-Derivaten muß während der Fermentation eine Schwefelquelle zugefüttert werden. Bevorzugt kommen dabei Sulfate oder Thiosulfate zum Einsatz.

Mikroorganismen, die nach dem beschriebenen Verfahren fermentiert werden, sezernieren in einem Batch- oder Fedbatch-Prozess nach einer Anwuchsphase in einem Zeitraum von 10 bis 150 Stunden Aminosäuren der Phosphoglyerat-Familie in hoher Effizienz in das Kulturmedium.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

#### **Beispiel 1: Klonierung des yfiK-Gens**

Das yfiK-Gen aus Escherichia coli Stamm W3110 wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Als spezifische Primer dienten die Oligonukleotide

yfiK-fw: (SEQ. ID. NO: 3)

5'-GGA ATT CAT TAA TGA TCC ATA ACC CCA AAC CTA TC-3'

und

yfiK-rev: (SEQ. ID. NO: 4)

5'-GCC TTA ATT AAG TAG CAA GTT ACT AAG CGG AAG-3'

Das resultierende DNS-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen AsnI und PacI verdaut, mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und isoliert (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, D). Die Klonierung erfolgte durch Ligation mit einem NdeI/PacI-geschnittenen Vektor pACYC184-cysEX-GAPDH, der in EP0885962A1 eingehend beschrieben wurde. Dieser Vektor enthält ein cysEX-Gen, das für eine Serinacetyltransferase mit verminderter Feedback-Hemmung durch L-Cystein kodiert, und 3'-seitig davon den konstitutiven GAPDH-Promoter des gapA-Gens. Durch das angegebene Vorgehen wird das yfiK-Gen so hinter dem GAPDH-Promotor plaziert, dass die Transkription von dort aus initiiert werden kann. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pG13 und ist in Abbildung 1 als Über-

sichtszeichnung gezeigt. Nach der Verifizierung des Konstrukts wurde der Escherichia coli Stamm W3110 transformiert und entsprechende Transformanten mit Tetracyclin selektiert. Der Bakterienstamm Escherichia coli W3110 / pG13 wurde bei der DSMZ  
5 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15095 gemäß Budapest Vertrag hinterlegt und in folgenden Beispielen als Produktionsstamm zur Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie genutzt. Als Vergleichsstamm zur Demonstration des  
10 Effektes der erhöhten Expression des yfiK-Gens wurde W3110 / pACYC184-cysEX gewählt, der ebenfalls in EP0885962A1 eingehend beschrieben ist, aber im Unterschied zu pG13 keine GAPDH-Promotor-yfiK-Sequenz enthält.

#### 15 **Beispiel 2: Vorkultur des Produktionsstammes**

Als Vorkultur für die Fermentation wurden 20 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl), das zusätzlich  
15 mg/l Tetracyclin enthielt, mit dem Stamm W3110 / pG13 bzw.  
20 W3110 / pACYC184-cysEX beimpft und bei 30°C und 150 rpm in einem Schüttler inkubiert. Nach sieben Stunden wurde der gesamte Ansatz in 100 ml SM1-Medium (12 g/l  $K_2HPO_4$ ; 3 g/l  $KH_2PO_4$ ; 5 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,3 g/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 0,015 g/l  $CaCl_2 \times 2 H_2O$ ; 0,002 g/l  $FeSO_4 \times 7 H_2O$ ; 1 g/l  $Na_3Citrat \times 2 H_2O$ ; 0,1 g/l NaCl; 1  
5 ml/l Spurenelementlösung bestehend aus 0,15 g/l  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ ; 2,5 g/l  $Na_3BO_3$ ; 0,7 g/l  $CoCl_2 \times 6 H_2O$ ; 0,25 g/l  $CuSO_4 \times 5 H_2O$ ; 1,6 g/l  $MnCl_2 \times 4 H_2O$ ; 0,3 g/l  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ ), das mit 5 g/l Glukose; 0,5 mg/l Vitamin B<sub>1</sub> und 15 mg/l Tetracyclin  
supplementiert wurde, überführt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C für 17 Stunden bei 150 rpm.  
30

#### **Beispiel 3: Fermentative Herstellung von O-Acetyl-L-Serin**

Als Fermenter diente ein Biostat M-Gerät der Firma Braun Biotech (Melsungen, D) mit einem maximalen Kulturvolumen von 2 l.  
35 Mit der in Beispiel 2 beschriebenen Vorkultur (optische Dichte bei 600 nm von ca. 3) wurde der Fermenter mit 900 ml SM1-Medium, das mit 15 g/l Glukose, 0,1 g/l Trypton, 0,05 g/l He-

feextrakt, 0,5 mg/l Vitamin B<sub>1</sub> und 15 mg/l Tetracyclin supplementiert wurde, beimpft. Während der Fermentation wurde eine Temperatur von 32 °C eingestellt und der pH-Wert durch Zudosierung von 25 % Ammoniak bei einem Wert von 6,0 konstant gehalten. Die Kultur wurde mit entkeimter Druckluft bei 1,5 vol/vol/min begast und mit einer Rührerdrehzahl von 200 rpm gerührt. Nach Absinken der Sauerstoffsättigung auf einen Wert von 50 % wurde die Drehzahl über ein Kontrollgerät bis zu einem Wert von 1200 rpm erhöht, um 50 % Sauerstoffsättigung zu erhalten (Bestimmt mit einer pO<sub>2</sub>-Sonde, kalibriert auf 100% Sättigung bei 900 rpm). Sobald der Glukose-Gehalt im Fermenter von anfänglich 15 g/l auf ca. 5-10 g/l abgesunken war, erfolgte eine Zudosierung einer 56 % Glukose-Lösung. Die Fütterung erfolgte mit einer Flußrate von 6-12 ml/h, wobei die Glukosekonzentration im Fermenter zwischen 0,5 - 10 g/l konstant gehalten wurde. Die Glukose-Bestimmung wurde mit dem Glukoseanalysator der Firma YSI (Yellow Springs, Ohio, USA) durchgeführt. Die Fermentationsdauer betrug 28 Stunden. Nach dieser Zeit wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die resultierenden Kulturüberstände wurden durch reversed phase HPLC an einer LUNA 5 µ C18(2)-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min analysiert. Als Eluent diente verdünnte Phosphorsäure (0,1 ml konz. Phosphorsäure / l). Die Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte der Hauptstoffwechselprodukte im Kulturüberstand. Diese sind O-Acetyl-L-Serin und N-Acetyl-L-Serin, das bei neutralen bis alkalischen Bedingungen zunehmend durch Isomerisierung aus O-Acetyl-L-Serin entsteht.

30

Tabelle 1:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]	
	O-Acetyl-L-Serin	N-Acetyl-L-Serin
W3110/pACYC184-cysEX	1,8	1,5
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	7,4	3,0

**Beispiel 4: Fermentative Herstellung von N-Acetyl-L-Serin**

5 Für die Herstellung von N-Acetyl-L-Serin wurde genauso wie in  
Beispiel 2 und 3 verfahren. Lediglich der pH-Wert in der Fer-  
mentation wurde auf den Wert 7,0 eingestellt. Dadurch wird die  
Isomerisierung von O-Acetyl-L-Serin zu N-Acetyl-L-Serin be-  
günstigt und als Hauptprodukt N-Acetyl-L-Serin erhalten. Die  
10 Fermentationszeit betrug 48 Stunden.

Tabelle 2:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]
	N-Acetyl-L-Serin
W3110/pACYC184-cysEX	5,8
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	9,2

15

**Beispiel 5: Fermentative Herstellung von L-Cystein und L-Cystein-Derivaten**

20 Für die Herstellung von L-Cystein wurde genauso wie in Bei-  
spiel 2 und 3 verfahren. Lediglich der pH-Wert in der Fermen-  
tation wurde auf den Wert 7,0 eingestellt und eine Zufütterung  
von Thiosulfat vorgenommen. Dabei wurde nach zwei Stunden eine  
Zudosierung einer 30 % Na-Thiosulfat-Lösung mit einer Rate von  
3 ml/h vorgenommen. Die Fermentationszeit betrug 48 Stunden.  
25 Die Produktion von L-Cystein wurde colorimetrisch mit dem Test  
von Gaitonde (Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627-  
633) verfolgt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Test  
nicht zwischen L-Cystein und dem in EP 0885962 A1 beschriebe-  
nen Kondensationsprodukt von L-Cystein und Pyruvat (2-Methyl-  
30 thiazolidin-2,4-dicarbonsäure) diskriminiert. LL-Cystin, das  
durch Oxidation aus L-Cystein entsteht, wird im Test durch Re-

duktion mit Dithiothreitol (DTT) in verdünnter Lösung bei pH 8,0 ebenfalls als L-Cystein nachgewiesen.

5 Tabelle 3:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]
	L-Cystein + Derivate
W3110/pACYC184-cysEX	4,6
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	7,5



## SEQUENZ PROTOKOLL

&lt;110&gt; Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von  
Aminosaeuren und Aminosaeure-Derivaten der  
Phosphoglycerat-Familie

&lt;130&gt; yfiK

10

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 750

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (110)..(694)

&lt;400&gt; 1

gatccataac cccaaaccta tcgaaaatat cgaatctaga atataaaaac attcattttt 60

30

ttaaatgttc cgtgtcgggt actgtctacc aaaacagagg agataacaa gtg aca ccg 118

Val Thr Pro

1

acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc gct atg acg 166

35

Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Met Thr

5

10

15

cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg tcg cat gga 214

	Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr Ser His Gly	
	20 25 30 35	
	ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg gga ttt ttg	262
5	Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu Gly Phe Leu	
	40 45 50	
	att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg gca gtg att	310
	Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu Ala Val Ile	
10	55 60 65	
	gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg gca tat att	358
	Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala Ala Tyr Ile	
	70 75 80	
15		
	gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag gaa gac gga	406
	Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys Glu Asp Gly	
	85 90 95	
20		
	ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct ttg cag ttt	454
	Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala Leu Gln Phe	
	100 105 110 115	
	gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg tcg acg ttt	502
	Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu Ser Thr Phe	
	120 125 130	
	gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt ggc gtc agc gtt	550
	Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly Val Ser Val	
30	135 140 145	
	ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg gcg ctg gcg	598
	Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp Ala Leu Ala	
	150 155 160	
35		
	ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc cag tta aat	646
	Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg Gln Leu Asn	
	165 170 175	

atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc att ttc tat 694  
 Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg Ile Phe Tyr  
 180 185 190 195

5

taacgaaaaa aagcggaaga ggtcgccctc ttccgcttag taacttgcta cttaag 750

<210> 2

10

<211> 195

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

15

Val Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr  
 1 5 10 15

Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr  
 20 25 30

20

Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu  
 35 40 45

Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu  
 50 55 60

Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala  
 65 70 75 80

30

Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys  
 85 90 95

Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala  
 100 105 110

35

Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu  
 115 120 125

Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly  
130 135 140

5 Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp  
145 150 155 160

Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg  
165 170 175

10 Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg  
180 185 190

Ile Phe Tyr  
195

15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 3

ggaattcatt aatgatccat aaccccaaac ctatc

35

&lt;210&gt; 4

30 &lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

35 &lt;223&gt; Primer for PCR

&lt;400&gt; 4

gccttaatta agtagcaagt tactaagcgg aag

33

## Patentansprüche

1. Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Deriva-  
5 ten geeignet ist, herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität eines yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.
- 10 2. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Pilz, eine Hefe oder ein Bakterium, vorzugsweise aus der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere bevorzugt der Art Escherichia coli, handelt.
- 15 3. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopienzahl des yfiK-Gens in dem Mikroorganismus erhöht ist oder die Expression des yfiK-Gens durch Einsatz geeigneter Promotoren oder Translationssignale gesteigert wurde.
- 20 4. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe konstitutiver GAPDH-Promotor des gapA-Gens, induzierbarer lac-, tac-, trc-, lambda-, ara und tet-Promotor.
5. Mikroorganismenstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Escherichia coli Stamm handelt, bei dem die erhöhte Aktivität eines yfiK-Genprodukts auf der Erhöhung der Kopienzahl des yfiK-Gens  
30 in einem pACYC-Derivat beruht.
6. Plasmid, dadurch gekennzeichnet, dass es ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.
- 35 7. Plasmid gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein genetisches Element zur Deregulierung des Cysteinestoffwechsels enthält.

8. Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismenstammes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in einen Ausgangsstamm ein Plasmid gemäß Anspruch 6 oder 7 eingebracht wird.
- 5
9. Verfahren zur Herstellung einer Aminosäure der Phosphoglycerat-Familie, dadurch gekennzeichnet, dass ein Mikroorganismenstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einer Fermentation eingesetzt und die produzierte Aminosäure aus dem Fermentationsansatz abgetrennt wird.
- 10
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismenstamm in einem Fermenter als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder vorzugsweise als fed-batch-Kultur angezogen wird.
- 15
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine C-Quelle während der Fermentation kontinuierlich zudosiert wird.
- 20
12. Verfahren einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als C-Quelle Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren dienen.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Dosierung der C-Quelle in einer Form erfolgt, die gewährleistet, dass der Gehalt an C-Quelle im Fermenter während der Fermentation in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l, besonders bevorzugt ist ein Bereich von 0,5 - 10 g/l gehalten wird.
- 30
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als N-Quelle Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysate verwendet werden.
- 35
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentation unter aeroben Wachstumsbedingungen erfolgt.

### **Zusammenfassung**

#### **Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie**

5

Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Derivaten geeignet ist, herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität eines yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.

10

Fig. 1: Plasmidkarte von pG13

